ミニレビュー

真正粘菌における新規ミトコンドリアヒストン様タンパク質Glomの解析

佐々木 成江

お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科 遺伝カウンセリングコース
(〒112-0012 東京都文京区大塚 2-1-1)

Identification and Characterization of a novel mitochondrial histone-like protein in *Physarum polycephalum*

Narie Sasaki

Genetic Counseling Program, Graduate School of Humanities and Science,
Ochanomizu University
(2-1-1 Otsuka, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8610, Japan)

要旨：生体内においてミトコンドリアDNAはタンパク質によって高度に折りたたまれたミトコンドリア核様体（ミトコンドリア核）で存在する。我々は、非常に凝縮した大型ミトコンドリア核様体を持つ生物の一つである真正粘菌*Physarum polycephalum*から、新規ミトコンドリアヒストン様タンパク質Glomを同定した。Glomは、N末端半分にポリプロリンを含むリジンに富む領域を持ち、C末端半分にHMG boxを持つ塩基性タンパク質であった。Glomは、ミトコンドリアDNA全体に結合し、DNAの凝縮を促進するが、その凝縮にはリジンリッチ領域が重要であった。また、Glomによる激しいDNAの凝縮は複製や転写などの機能発現を全く阻害せず、その機能発現にはポリプロリンが重要であった。さらに、Glomは大腸菌のヒストン様タンパク質であるHUの機能を相補し、その機能相補にはHMGボックス領域が重要であった。

Summary : Mitochondrial DNA (mtDNA) is packed into highly organized structures called mitochondrial nucleoids (mt-nucleoids). We identified and characterized a new mitochondrial histone-like protein, termed Glom (a protein inducing agglomeration of mitochondrial chromosome), from highly condensed mt-nucleoids of the true slime mold, *Physarum polycephalum*. This protein has a lysine-rich region with proline-rich domain in the N-terminal half and two HMG boxes in C-terminal half. Glom induced intensive DNA condensation without suppressing replication and transcription. The lysine-rich region was sufficient for the mtDNA condensation and the proline-rich domain was essential to keep those genetic activities. The expression of Glom also complemented the *E. coli* mutant lacking the bacterial histone-like protein HU and the HMG-boxes region of Glom was important for the complementation.

Key Words : Glom, mitochondrial nucleoid, histone-like protein, HMG-box

1. はじめに

ミトコンドリアは独自のDNAを含有し、細胞核の遺伝情報にかなりの部分を依存しつつも半自立的に増殖する細胞小器官である。ミトコンドリア内でDNAは、様々なタンパク質とともに高次の複合体を形成し、ミトコンドリア核様体（ミトコンドリア核）として存在する（Kuroiwa, 1982）。高等真核生物のミトコンドリア核様体には、約17 kbpのDNAが2–5分子しか含まれておらず、DAPI蛍光顕微鏡法では多くの場合小さなスポットにしか観察されない。また、電子顕微鏡では、大部分のミトコンドリアDNAは周辺の電子密度が高い領域に埋もれてしまい、ごく一部のみが電子密度の低い白く抜けた部分に繊維状に観察されるのみであり、in vivoの状態を反映した詳細な構造解析は不可能である。一方、真正粘菌は、非常に発達した棒状のミトコンドリア核様体を持つ（図1A）。一つのミトコンドリア核様体には、63 kbpの環状ミトコンドリアDNAが40–80コピー含まれている（Kuroiwa and Kuroiwa, 1980, Takano et al., 2001）。電子顕微鏡においても、電子密度の高い構造としてミトコンドリア核様体をはっきり観察することができ（図1B）、形態・構造学的な解析に非常に優れた材料といえる。

真正粘菌のミトコンドリア核様体内のDNAは非常に凝縮しており、そのパッキング率は細胞核のヘテロクロマチンに相当する。一般に、ヘテロクロマチンのようなDNAが強く圧縮された状態は不活発な状態であり、DNA合成や遺伝子発現などの活性は低いと考えられる。しかし、ミトコンドリア核様体は活発にDNA合成やRNA合成を行っている。このことは、ミトコンドリア核様体内でDNAは、ミトコンドリアゲノムの機能発現を妨げることなく、効率よく圧縮できる方法で組織化されていると考えられる。このようなミトコンドリア核様体の高次構造は、DNAとタンパク質の相互作用により保たれている。実際、真正粘菌から単離したミトコンドリア核様体を電子顕微鏡で観察すると、ヌクレオソーム様のビーズ状構造を観察することができるが（図1C）、それをプロテアーゼ処理すると、多数のミトコンドリアDNA分子が裸出してくる（図1D）。細胞核では、主要な構造タンパク質として塩基性タンパク質であるヒストンが挙げられる。ヒストンはDNAと非特異的に結合してヌクレオソームを形成する。ヌクレオソームは、ヒストン八量体（H2A・H2B・H3・H4）の周りにDNA（147 bp）が約2回巻きついた構造体であり、DNAの高次構造の基本単位である。現在のところ、ミトコンドリアDNAがこのようなヌクレオソーム構造をとるか否かは不明である。

これまでに、ミトコンドリア核様体にもヒストン様タンパク質があることが予想され、いくつかの生物で探索されてきた。酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）では、約20 kDaの塩基性タンパク質であるAbf2pが同定されている（Caron *et al.*, 1979, Diffley and Stillman, 1991）。Abf2pは、ミトコンドリア核様体タンパク質の主要構成成分の一つであり、ミトコンドリアDNAのパッケージングに関与する。Abf2pは、HMGタンパク質のDNA結合モチーフであるHMGボックスを二つ含む。HMGタンパク質は、ヒストンに続く主要な核タンパク質であり、DNAとの結合はヒストンと比較して弱

図1. 真正粘菌のミトコンドリア核様体
A: DAPI染色による蛍光顕微鏡像
B: ミトコンドリアの電子顕微鏡像(TEM)
C: 単離ミトコンドリア核様体のネガティブ染色による電子顕微鏡像
D: プロテアーゼ処理後のミトコンドリア核様体の電子顕微鏡像

く、可逆的である。このようなHMGボックスを持つタンパク質は、ミトコンドリアの転写因子 (TFAM) としてヒトや*Xenopus*をはじめ様々な高等動物でも見つっている (Parisi and Clayton, 1991, Antoshechkin and Bogenhagen, 1995)。また、ヒトや*Xenopus*では、TFAMはミトコンドリア内に大量に存在することから、転写因子としてだけではなく、ミトコンドリアDNAのパッケージングにも重要な働きをしていると考えられている。一方、トリパノソーマからは、リジン含量が高く、ヒストンH1と相同性が高い20 kDa以下の塩基性タンパク質 (p16・p17・p18・p19・p21) が同定されている (Xu *et al.*, 1996, Hines and Ray, 1998)。トリパノソーマのミトコンドリア核様体 (キネトプラストDNAディスク) は、電子密度の高い円盤状の構造をしており、その中には約5,000分子の小環状DNAと20-30分子の大環状DNAが含まれている。精製したタンパク質をそれらのキネトプラストDNAに添加すると、DNAの凝縮が見られることから、それらのタンパク質は核様体の高次構造に重要であると考えられている。これまでに、これらの2つのタイプのミトコンドリアヒストン様タンパク質が同定されているが、筆者らは真正粘菌から新規ミトコンドリアヒストン様タンパク質であるGlomを同定し、いくつかの新しい知見を得てきた (Sasaki *et al.*, 2003)。このミニレビューでは、その内容を中心に概説する。

2. 真正粘菌のミトコンドリアヒストン様タンパク質Glomの同定

真正粘菌のミトコンドリア核様体の高次構造に
関与するタンパク質を同定するために、単離したミトコンドリア核様体を様々な濃度のNaClで処理し、核様体の高次構造が解体される際に遊離してくるタンパク質を調べた。図2Aで示すように、ミトコンドリア核様体の高次構造は、0.2 MのNaCl処理で解体されはじめ、0.3 M以上では完全に解体されたことから、高次構造に関与するタンパク質は、0.2-0.3Mで遊離してくると推定された。また、NaCl処理でミトコンドリア核様体から遊離してくるタンパク質をSDS-PAGEで調べたところ、高次構造の解体が観察されはじめる0.2-0.3M 付近で、ミトコンドリア核様体の主要構成タンパク質である41kDaタンパク質が遊離することがわかった (図2B)。

そこで、ミトコンドリア核様体から41kDaタンパク質を精製し、DNA結合能をゲルシフト法により調べた。精製した41kDaタンパク質と*Xba*Iで切断したミトコンドリアDNA断片を同時にインキュベートし、アガロースゲル電気泳動をおこなったところ、41kDaタンパク質はすべてのDNA断片に結合した。このことは、41kDaタンパク質は非特異的にDNAに結合することを示している。また、他の断片と比較し

図2. NaCl処理によるミトコンドリア核様体の解体

- A: 単離ミトコンドリア核様体を様々なNaCl濃度で処理し、DAPI染色し、蛍光顕微鏡で観察した。
B: NaCl処理した単離ミトコンドリア核様体を遠心し、沈殿 (ppt) と上清 (sup) をそれぞれSDS-PAGEした。Mt はミトコンドリア、MN はミトコンドリア核様体を示す。

図3. 精製した 41kDa タンパク質を用いたミトコンドリア核様体の解体-再構成

0.3 MNaCl 処理により解体したミトコンドリア核様体を透析し、再構成したものを DAPI 染色により観察した。
A: 透析のみ、B: 遠心後に上清を除去して透析、C: 上清の除去後に 41kDaタンパク質を添加して透析

図4. 抗 Glom 抗体を用いた細胞染色
抗 Glom 抗体により、ミトコンドリア核様体が特異的に、かつ一様に染色された。

て18.4kbpのDNA断片に対する親和性が高く、このような親和性の差は、ラムダファージDNA断片を用いた際には見られなかったことから、41kDaタンパク質はミトコンドリアDNAの一部の領域に対しては選択的に結合しやすい性質をもつといえる。ABF2やTFAMにおいても、DNAに対して非特異的に結合するが、ミトコンドリアDNAの複製や転写開始点付近と親和性が高いことが報告されている (Fisher *et al.*, 1987, Diffley and Stillman, 1992)。真正粘菌において、ミトコンドリアDNAの複製や転写開始点はまだ決定されていないが、18.4 kbpの断片にはミトコンドリア膜に結合する領域が含まれており (Kawano and Kuroiwa, 1985, Kuroiwa *et al.*, 1994)、バクテリアとの類似性からその領域付近がミトコンドリアDNAの複製や転写開始に関与している可能性は高い (Hoshino *et al.*, 1987, Yung and Kornberg, 1988)。

次に、41 kDaタンパク質がDNAを凝縮させるかどうかを調べるために、ミトコンドリア核様体の解体-再構成系を用いた解析をおこなった (図3)。ミトコンドリア核様体の高次構造の解体-再構成は、塩濃度を変化させることによって行うことができる。0.3M NaCl処理により解体されたミトコンドリア核様体は、透析により徐々に塩濃度を下げることにより棒状の核様体に再構成される (図3A)。一方、透析前に、0.3MNaCl処理で遊離してきたタンパク質を遠心により除去すると再構成は生じない (図3B)。そこで、そこに精製した41kDaタンパク質を添加し、透析をおこなうことで再構成が見られるかどうか調べた。その結果、41kDaタンパク質を添加したものでは、非常に凝縮した核様体が再構成されることがわかった (図3C)。また、再構成されたミトコンドリア核様体は棒状ではないことから、棒状構造にはそのほかの因子が関与していることが示唆され、41kDaタンパク質をミトコンドリアゲノムの凝縮 (agglomeration) を促進するタンパク質ということで Glomと名づけた。

抗Glom抗体を作成し、細胞染色を行ったところ、Glomはミトコンドリア核様体特異的に局在していた (図4)。また、ミトコンドリア核様体が一様に染色されたことから、GlomはミトコンドリアDNA全体に結合していることがわかった。実際、ミトコンドリア核様体に含まれるGlom含量から計算すると、GlomはミトコンドリアDNAあたり約20bpに一分子結合している。これは、ミトコンドリアDNA全体をカバーするのに十分な量であり、Glomはヒストン様の構造タンパク質であるといえる。


```

1  M L A T L A L R R S L C V A T S L N A V Q P Q I V
26 L S A H Y S V G K G K P T P K A V T P A K K A P P
51 P P P A R K G T P P P P A K K S T P P P P T G K K
76 P A Q N T V V A K K P A A K T P P P P V K K P S P
101 P Q G S K G T V V V K A Q Q A A K E K A K E K A
126 Q K E K E R D K E A R E R Q R E K E R L A K E K A
151 K E K E D M A K E K E R D R K L K E K E K E Q Q H
176 K E K E K E K E K K L I K K E R A D R E K Q E I A
201 E K K R E E K A K K D A M P S R P K S A Y I C F A
226 V E A R P T I V K E N P Q L P V T A V L G E I A K
251 R W T A L P K D K R Q K Y D Q L A E Q D R A R F E
276 R E L K E F K K S Y P D P P K R A L S A F S I F V
301 Q E N S A I I K K A Q P K A K V T E I M K Q L S K
326 Q W N T I S A D K K K K Y E D A A A Q D R V R Y L
351 K E K E E F D D E H G K *

```

図5. Glom のアミノ酸配列

アミノ酸シーケンスにより決定された N- 末端および2つの内部アミノ酸配列を下線で示す。Glom は、31番目のセリン (V) から始まる。枠で囲った部分は、N- 末端側に存在するポリプロリンを示す。

図6. Glom の機能ドメインの解析

A: Glomの模式図 TP はミトコンドリアに輸送されるためのターゲティングペプチドを示す。

B: Glom の組換えタンパク質のコンストラクト。

C: 組換えタンパク質を用いたミトコンドリア核様体の解体-再構成上記の番号は、添加したそれぞれの組換えタンパク質の番号を示す。

3. Glomの一次構造の決定

Glom遺伝子を決定するために、精製したGlomを用いてN末端と内部アミノ酸配列をアミノ酸シーケンスにより決定し、そこからdegenerated プライマーを作成し、PCRをおこなった。増幅してきたDNA断片をプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングしたところ、362アミノ酸からなるGlom遺伝子の全長が決定された (図5)。この遺伝子は、ミトコンドリアゲノム上にコードされていないことから (Takano *et al.*, 2001)、核ゲノム上にコードされていると考えられる。また、アミノ酸シーケンスにより得られたN末端のアミノ酸配列は31番目から始まっていることから、最初の30アミノ酸はミトコンドリアへ輸送されるためのターゲティングペプチドであると推定される。

Glomはリジンを多く含み (21.7%)、推定等電点10.4の塩基性タンパク質であった。ホモロジー検索をしたところ、C-末端側半分に二つのHMGボックスがあることがわかった (図6 A)。Abf2pやTFAMも同様に二つのHMGボックスを持っているが、ほぼその領域のみからなるタンパク質である。それらのタンパク質と比較すると、GlomはN-末端側に5箇所の特徴的なポリプロリン (PPPP) をもつリジン含量の高い (26.8%) 長い配列をもっていた。このリジン含量は、クロマチンの凝縮を促進するヒストンH1に相当する。トリパノソーマのp16・p17・p18・p21もリジン含量が高く、ヒストンH1と相同性が高いが (Xu *et al.*, 1996, Hines and Ray, 1998)、HMGボックスを含まない。よって、Glomはリジンリッチ領域とHMGボックスの両者を含む新しいタイプのミトコンドリア

図 7. Glom の組換えタンパク質発現が大腸菌に与える影響

A: それぞれの組換えタンパク質を大腸菌で発現させ、SYTO11によりDNAを生体染色し観察した。B: 大腸菌の細胞増殖をOD600で測定した。C: 大腸菌のDNA/RNA合成量を³Hチミジンと³HウリジンのDNAへの取り込みで測定した。また、rGlomIVに関しては、発現量が低かったため解析できなかった。

アヒストン様タンパク質であるといえる。

また、Glomの様々な領域を含む組換えタンパク質を大腸菌で作成し（図6B）、それぞれの領域のDNA結合能をゲルシフト法により調べたところ、HMGボックス領域だけではなく、リジンリッチ領域、ポリプロリン領域にもDNA結合能があることがわかった。このことは、GlomはDNAと複数箇所で結合している可能性を示唆している。また、それぞれの領域のDNA凝縮能を解体-再構成系を用いて調べたところ、リジンリッチ領域を含む組換えタンパク質（rGlom I・II・IV・V・VIII）はDNA凝縮能を持つが、HMGボックス領域のみ（rGlom III・VI・VII）ではDNA凝縮能を持たないことがわかった（図6C）。

4. 大腸菌を用いたGlomの解析

大腸菌におけるゲノムDNAのパッケージング率は低く、真正粘菌のミトコンドリア核様体と比較すると約1/10である。大腸菌でGlomの全長（rGlom I）を発現させると、Glomは大腸菌DNAに結合し、核様体の激しい凝縮を引き起こした（図7A）。このような核様体の凝縮は、クラミジアで同定されたヒストンH1様タンパク質（Hc1）を大腸菌で過剰発現した際にも観察されている（Barry *et al.*, 1992）。Hc1は、クラミジア感染初期段階である代謝的に不活性なエレメンタルボディの時期に特異的に発現するタンパク質である（Hackstadt *et al.*, 1991）。エレメンタルボディ内のクロマチンは非常に凝縮しており、Hc1はその凝縮に関与していると考えられている。このHc1を大腸菌で発現させると、核様体の凝縮とともに大腸菌の増殖阻害、DNA/RNA合成阻害を引き起こすことが報告されている（Barry *et al.*, 1993）。しかし、面白いことにGlomを発現させた大腸菌では核様体が非常に凝縮しているにもかかわらず、大腸菌の増殖（図7B）、DNA/RNA合成（図7C）には全く影響を

与えなかった。このようなGlomの性質は、真正粘菌の強く凝縮したミトコンドリア核様体でDNAの機能発現するために重要な役割を果たしていると考えられる。

では、Glomのどの領域が凝縮したDNAの機能発現に重要なのであろうか？様々な領域の組換えタンパク質を大腸菌で過剰発現させたところ、解体-再構成系を用いた実験結果と同様にHMGボックス領域のみを発現した大腸菌 (rGlom III) では核様体の凝縮は起こらず、リジンリッチ領域を含むタンパク質を発現させたとき (rGlom II・V・VIII) に核様体の凝縮が見られた (図7A)。また、ポリプロリン領域を削除したもの (rGlom・V・VIII) で、核様体の凝縮と同時に著しい増殖阻害 (図7B)、DNA/RNA合成阻害がみられた (図7C)。これらは、ポリプロリン領域が凝縮したDNAの機能発現に重要であることを示している。これまでに、プロリンリッチな領域は、真核生物の転写因子の転写活性ドメインの一つとして知られている (Mermoud *et al.*, 1989, Gerster *et al.*, 1990, Tanaka *et al.*, 1994)。特に、転写因子であるCTF/NF1のプロリンリッチ領域は、転写活性装置やヒストンH3に直接結合することにより転写を活性化することが知られている (Kim and Roeder, 1994, Chiang and Roeder, 1995, Alevizopoulos *et al.*, 1995)。また、一般的にプロリンリッチな領域はステッキなアームとして働くことが知られており、その結合は迅速かつ可逆的で、タンパク質やポリフェノールやDNAなど幅広い物質に結合する (Williamson, 1994)。このようなプロリンリッチ領域の柔軟性のある性質が、凝縮したDNAに対するタンパク質の接近を可能とさせ、その結果として機能発現を促進しているのかもしれない。

5. 大腸菌ヒストン様タンパク質HUに対するGlomの機能的相補

HUは、大腸菌のヒストン様タンパク質として同定されたタンパク質であり、細胞内に大量に存在し、DNAと非特異的に結合しパッケージングを促進する (Rouviere-Yaniv and Gros, 1975, Rouviere-Yaniv *et al.*, 1979)。また、HUは複製、組換え、染色体の分配など様々な機能に関与していることも報告されている。HUは、*hupA*と*hupB*遺伝子にコードされる二つのサブユニットからなるヘテロ二量体であり、*hupA*と*hupB*のどちらかの遺伝子を欠損した変異株は、正常な表現型を示

図8. HU 欠損株を用いた Glom の相補実験

A: 細胞のフィラメント化に関する解析
HU 欠損株でGlom 組換えタンパク質を過剰発現し、細胞の形態を観察した。枠内は、SYTO11によるDNAの生体染色像を示す。

B: 低温感受性に関する解析
HU 欠損株で Glom 組換えタンパク質を過剰発現したものを、0°Cでインキュベートした後に、プレートにまき、コロニー数を測定した。野生型を100%としてその他の値を示した。

すが、両方の遺伝子を欠質した変異株では、フィラメント状の形態や低温感受性を示す (Wada *et al.*, 1988)。これまでに、HU欠損株でのAbf2pやp16/p17/p18の発現は、変異株でのフィラメント状への形態変化を回復することから、HUとアミノ酸配列上の類似性は見られないが、機能的には類似していると考えられている (Megraw and Chae, 1993, Xu *et al.*, 1996)。そこで、GlomもHUの機能を相補できるかどうか調べてみた。その結果、Glomの全長 (rGlom I) はHU欠損株のフィラメント状への形態変化(図8A)や低温感受性を回復させることがわかった (図8B)。また、HUの機能相補にはリジンリッチ領域 (rGlom II) ではなくHMGボックス領域 (rGlom III) が重要であった。

6. 終わりに

ミトコンドリアや色素体の祖先は、原核生物が内部共生したものであると考えられている。大腸菌で同定されたHUは、多くの細菌で同定されており、ミトコンドリアの祖先に最も近い生物の一つであるリケッチアからも同定されている (Anderson *et al.*, 1998)。また、HUのホモログは、いくつかの原始的な紅藻類の色素体からも見つかっており、色素体DNAのパッケージングに重要な働きをしていることがわかっている (Kobayashi *et al.*, 2002)。しかし、ミトコンドリアからはまだ見つかっていない。Glomを含めてこれまでに同定されたミトコンドリアヒストン様タンパク質の相補実験の結果を考えると、HUは進化上かなり初期段階で機能的に類似した細胞核由来のHMGボックスタンパク質やヒストンH1に置換されたと推定できる。また、生物種によって様々なタイプのミトコンドリアDNAパッケージングタンパク質が同定されていることから、ミトコンドリアヒストン様タンパク質は進化の過程で変化しているといえる。では、それらのタンパク質の進化は何を意味するのであろうか？それぞれの生物のミトコンドリア核様体の高次構造を比較してみると、真正粘菌やトリパノゾーマなどリジン含量の高いタンパク質によって構成されるミトコンドリア核様体の電子密度は高く、酵母や高等生物などのHMBボックスタンパク質によって構成されるミトコンドリア核様体の電子密度は低い。これは、HMGボックス領域よりもリジンリッチ領域のほうがDNAをパッケージングする能力が高いというパッケージングの差を反映していると考えられる。そのような高いパッケージング能は、真正粘菌やトリパノゾーマに見られる大型のミトコンドリア核様体の維持に重要なものかもしれない。また、Glomはリジンリッチ領域とHMGボックス領域の両者を持っていることから、ミトコンドリアヒストン様タンパク質の進化の過渡的な段階にあると考えられる。

謝辞

本総説に関連する研究を行うにあたり立教大学の黒岩常祥先生および黒岩晴子先生、お茶の水女子大学の室伏きみ子先生にご指導・ご助言をいただいたことに深く感謝いたします。

引用文献

- Alevizopoulos, A., Dusserre Y., Tsai-Pflugfelder, M., von der Weid, T., Wahli, W. and Mermoud, N. (1995) A proline-rich TGF-beta-responsive transcriptional activator interacts with histone H3. *Genes Dev.* 15: 3051-3066.

- Andersson, S.G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U.C., Podowski, R.M., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H. and Kurland, C.G. (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396: 133-140.
- Antoshechkin I. and Bogenhagen, D.F. (1995) Distinct roles for two purified factors in transcription of *Xenopus* mitochondrial DNA. *Mol. Cell. Biol.* 15: 7032-7042.
- Barry, III, C.E., Hayes, S.F. and Hackstadt, T. (1992) Nucleoid condensation in *Escherichia coli* that express a chlamydial histone homolog. *Science* 256: 377-379.
- Barry, III, C.E., Brickman, T.J. and Hackstadt, T. (1993) Hc1-mediated effects on DNA structure: a potential regulator of chlamydial development. *Mol. Microbiol.* 9: 273-283.
- Caron, F., Jacq, C. and Rouvière-Yaniv, J. (1979) Characterization of a histone-like protein extracted from yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4265-4269.
- Chiang, C. M. and Roeder, R.G. (1995) Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 267: 531-536.
- Diffley, J.F.X. and Stillman, B. (1991). A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 7864-7868.
- Fisher, R.P., Topper, J.N. and Clayton, D.A. (1987) Promoter selection in human mitochondria involves binding of a transcription factor to orientation-independent upstream regulatory elements. *Cell* 50: 247-258.
- Gerster, T., Balmaceda, C.-G. and Roeder, R.G. (1990) The cell type-specific octamer transcription factor OTF-2 has two domains required for the activation of transcription. *EMBO J.* 9: 1635-1643.
- Hackstadt, T., Baehr, W. and Ying, Y. (1991) *Chlamydia trachomatis* developmentally regulated protein is homologous to eukaryotic histone H1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 3937-3941.
- Hoshino, T., McKenzie, T., Schmidt, S., Tanaka, T., Sueoka, N. (1987) Nucleotide sequence of *Bacillus subtilis* dnaB: a gene essential for DNA replication initiation and membrane attachment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 653-657
- Hines J.C. and Ray, D.S. (1998) The *Crithidia fasciculata* KAP1 gene encodes a highly basic protein associated with kinetoplast DNA. *Mol. Biol. Parasitol.* 94: 41-52.
- Kawano, S., and Kuroiwa, T. (1985) Isolation and characterization of a membrane-DNA complex in the mitochondrial of *Physarum polycephalum*. *Exp. Cell Res.* 16: 460-472
- Kim, T.K. and Roeder R.G. (1994) Proline-rich activator CTF1 targets the TFIIB assembly step during transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 4170-4174.
- Kobayashi, T., Takahara, M., Miyagishima, S., Kuroiwa, H., Sasaki, N., Ohta, N., Mastuzaki, M. and Kuroiwa, T. (2002) Detection and localization of chloroplast-encoded HU-like protein that organizes chloroplast nucleoids. *Plant Cell* 14: 1579-1589.
- Kuroiwa, T. and Kuroiwa, H. (1980) Inhibition of *Physarum* mitochondrial division by cytochalasin B. *Experientia* 36: 193-194.

- Kuroiwa, T. (1982) Mitochondrial nuclei. *Int. Rev. Cytol.* 75: 1-59.
- Kuroiwa, T., Ohta, T., Kuroiwa, H. and Kawano, S. (1994) Molecular and cellular mechanisms of mitochondrial nuclear division and mitochondriokinesis. *Microsc. Res. Tech.* 27: 220-232.
- Megraw, T.L. and Chae, C.B. (1993) Functional complementarity between the HMG1-like yeast mitochondrial histone HM and the bacterial histone-like protein HU. *J. Biol. Chem.* 268: 12758-12763.
- Mermod, N., O'Neill, E.A., Kelly T.J. and Tjian, R. (1989) The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-1 is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell* 58: 741-753.
- Parisi, M.A. and Clayton, D.A. (1991) Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science* 252: 965-969.
- Rouvière-Yaniv, J. and Gros, F. (1975) Characterization of a novel low-molecular-weight DNA-binding protein from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 3428-3432.
- Rouvière-Yaniv, J., Yaniv, M., and Germond, J.E. (1979). *E. coli* DNA binding protein HU forms nucleosome like structure with circular double-stranded DNA. *Cell* 17: 265-274.
- Sasaki, N., Kuroiwa, H., Nishitani, C., Takano, H., Higashiyama, T., Kobayashi, T., Shirai, Y., Sakai, A., Kawano, S., Murakami-Murofushi, K., and Kuroiwa, T.(2003) Glom is a novel mitochondrial DNA packaging protein in *Physarum polycephalum* and causes intense chromatin condensation without suppressing DNA functions. *Mol. Biol. Cell* 14:4758-4769.
- Takano, H., Abe, T., Sakurai, R., Moriyama, Y., Miyazawa, Y., Nozaki, H., Kawano, S., Sasaki, N. and Kuroiwa, T. (2001) The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Physarum polycephalum*. *Mol. Gen. Genet.* 264: 539-545.
- Tanaka, M., Clouston, W.M. and Herr W. (1994) The Oct-2 glutamine-rich and proline-rich activation domains can synergize with each other or duplicates of themselves to activate transcription. *Mol. Cell. Biol.* 14: 6046-6055.
- Xu, C.W., Hines, J.C., Engel, M.L., Russell, D.G. and Ray, D.S. (1996) Nucleus-encoded histone H1-like proteins are associated with kinetoplast DNA in the Trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *Mol. Cell. Biol.* 16: 564-576..
- Wada, M., Kano, Y., Ogawa, T., Okazaki, T. and Imamoto F. (1988) Construction and characterization of the deletion mutant of *hupA* and *hupB* genes in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 204: 581-91.
- Yung, B.Y. and Kornberg, A. (1988) Membrane attachment activates dnaA protein, the initiation protein of chromosome replication in *Escherichia coli*. *Proc. Natul. Acad. Sci. USA* 85: 7202-7205